

EP/04/1997

Mod. C.E. - 1-4-7

MODULARIO
L.C.A. - 101



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 03 JUN 2004

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

MI2003 A 000434



*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

26 MAR. 2004

oma, li

IL FUNZIONARIO

D.ssa Maria Luisa FOCA*

Maria Luisa Foca

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **ISTITUTO ONCOLOGICO ROMAGNOLO COOPERATIVA SOCIALE A R.L.**
Residenza **Forlì** codice **000000000000000000**
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Bianchetti Giuseppe ed altri
cognome nome _____ cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza **Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.**
via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____

"Metodo per l'individuazione di tumori del colon-retto"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

1) **Calistri Daniele** cognome nome _____
2) **Rengucci Claudia** _____ 3) _____
4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) _____	_____	_____	____/____/____	_____
2) _____	_____	_____	____/____/____	_____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Doc. 1) ☒ **PROV** n. pag. **14** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)....
Doc. 2) ☒ **PROV** n. tav. **06** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare).....
Doc. 3) ☒ **RIS** lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale **XXXXXXXXXXXXXXXXXX**
Doc. 4) ☒ **RIS** designazione inventore
Doc. 5) ☒ **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) ☒ **RIS** autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) ☒ nominativo completo del richiedente

Centottantotto/51#

8) attestati di versamento, totale Euro

07 03 2003COMPILATO IL **NO**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Banfi Paolo

obbligatorio

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2003A 000434codice **115**L'anno **DUEMILATRE**il giorno **SETTE**, del mese di **MARZO**Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata da **001** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

L. DEPOSITANTE

Daniela Renda

L'UFFICIALE ROGANTE

M: CORTONESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO

// _/_/ _/_/_

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

// _/_/ _/_/_

D. TITOLO

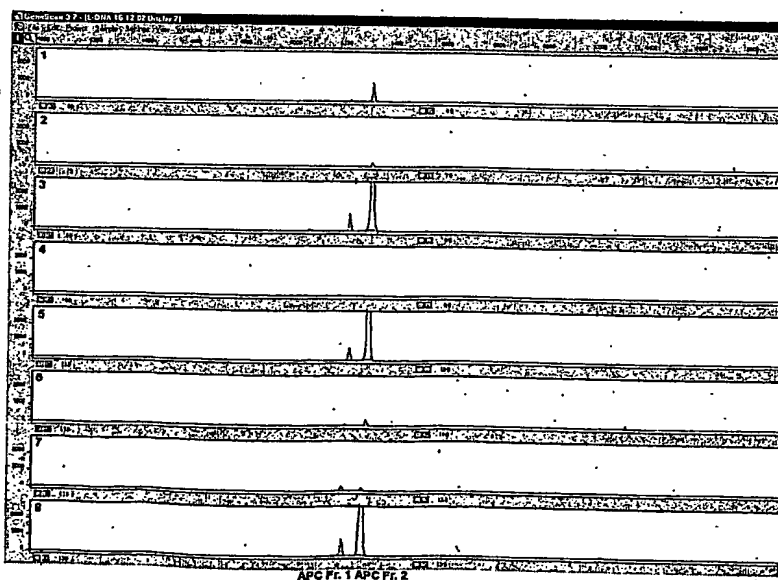
"Metodo per l'individuazione di tumori del colon-retto"

L. RIASSUNTO

Si descrive un metodo per la diagnosi precoce del carcinoma coloretale e per la determinazione di lesioni pre-cancerose del colon-retto basato sulla quantificazione del DNA estratto dalle feci e amplificato con tecniche PCR.

M. DISEGNO

Figura 1b
Risultati



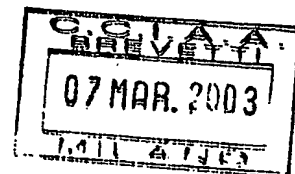
3 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

nc "METODO PER L'INDIVIDUAZIONE DI TUMORI DEL COLON-
RETTO"

a nome : ISTITUTO ONCOLOGICO ROMAGNOLO
COOPERATIVA SOCIALE A R.L.

con sede in: Forlì

MI 2003 A 0 0 0 4 3 4
* * *



La presente invenzione riguarda in generale la diagnosi della malattia tumorale in soggetti umani o animali. Più precisamente, viene fornito un metodo per la diagnosi precoce del carcinoma coloretale e per la determinazione di lesioni pre-cancerose del colon-retto e un kit per la sua attuazione. Il metodo dell'invenzione è basato sulla quantificazione del DNA estratto dalle feci e amplificato con tecniche PCR.

INTRODUZIONE

Il carcinoma del colon-retto rappresenta la seconda causa di morte per cancro nelle popolazioni occidentali (1). La sopravvivenza a questo tumore è direttamente correlata con lo stadio al momento della diagnosi.

Tutti i pazienti a cui viene asportato chirurgicamente un polipo contenente un carcinoma *in situ* o intramucosa sopravvivono. Al contrario, la sopravvivenza scende da 80% a meno del 30% in funzione della diffusione del tumore al momento della diagnosi (2, 3). È quindi evidente come una diagnosi precoce è fondamentale nel ridurre la mortalità. Inoltre, la possibilità di individuare anche lesioni preneoplastiche aumenta l'importanza di programmi di screening diagnostici per questa patologia.

Al momento, il sistema di indagine più diffuso è l'esame del sangue

occulto nelle feci (FOBT, fecal occult blood test). Studi randomizzati, basati sull'utilizzo del FOBT per la diagnosi del tumore del colon-retto, hanno evidenziato una riduzione nella mortalità per questa malattia, ma in misura decisamente minore rispetto a quanto sarebbe stato auspicabile attendersi. Pertanto, il suo utilizzo è ancora molto dibattuto (2).

I principali problemi di questo test sono legati alla sensibilità della metodica che raramente supera il 50% e al fatto che quasi mai è in grado di evidenziare adenomi e/o tumori ai primi stadi di sviluppo (2).

Metodi di indagine, sicuramente più accurati e attendibili, per gli adenomi e tumori colorettali sono la colonscopia e la sigmoidoscopia. Le limitazioni di queste metodiche sono l'invasività e quindi l'accettabilità da parte del paziente, i tempi e i costi di indagine che ne rendono improponibile l'uso in programmi di screening (4).

Un interessante approccio, recentemente proposto, è la rilevazione di alterazioni molecolari. È noto che le lesioni del colon derivano da una serie di alterazioni a carico di particolari oncogeni ed oncosoppressori ed a eventi epigenetici (5-7). Nei diversi modelli di progressione proposti per il tumore del colon, i geni coinvolti nella trasformazione neoplastica sono principalmente *APC*, *K-ras* e *p53*. Alterazioni a carico di questi geni possono pertanto essere utilizzate come marcatori nella individuazione di cellule tumorali.

L'affluenza di cellule di esfoliazione del colon nelle feci, in quantità pari a circa 10^{10} cellule al giorno, suggerisce l'impiego di materiale fecale per ottenere DNA idoneo per la determinazione di alterazioni molecolari e l'individuazione di lesioni cancerose a livello dell'epitelio intestinale. L'estrazione di DNA da materiale fecale e la successiva analisi di mutazione

potrebbero quindi rappresentare un nuovo approccio diagnostico non invasivo, in alternativa o ad integrazione delle tecniche fino ad oggi utilizzate per l'individuazione dei tumori colorettali.

La presenza di mutazioni nel DNA estratto dalle feci è stata analizzata in diversi studi focalizzati prevalentemente ad un particolare gene bersaglio (8-19). Il primo gene analizzato è stato K-ras (8) ed è stato possibile dimostrare che questo tipo di approccio è in grado di individuare lesioni del colon con alta specificità. Successivamente, altri numerosi studi hanno analizzato questo gene, considerata anche la relativa facilità di individuare le sue alterazioni sempre comprese in soli tre codoni hot-spot (9, 10, 12, 14, 16, 17). Alcuni studi sono stati indirizzati all'analisi di altri marcatori molecolari, quali p53 APC o il microsatellite BAT26, ottenendo anche in questo caso soddisfacenti risultati (11, 15, 18, 19). Tuttavia, da tutti questi studi è emerso come l'analisi di un singolo marcatore, quale esso sia, non permetta di ottenere un'elevata sensibilità, per la frequenza relativamente bassa delle alterazioni presenti nei singoli geni.

Studi più recenti hanno tentato di superare questa limitazione con l'analisi simultanea di più marcatori (20-22).

I risultati, anche se più promettenti, hanno evidenziato l'esistenza di un numero ancora elevato di falsi negativi a fronte di un'analisi molto più laboriosa, con costi e tempi maggiori, e pertanto difficilmente utilizzabile su larga scala.

Da uno di questi studi (22) è emerso che il grado d'amplificazione del DNA fecale, e quindi il suo stato di conservazione, sarebbe un valido indicatore di presenza di cellule tumorali (22). In particolare, si è visto che la semplice analisi dei livelli di amplificato del DNA fecale (L-DNA: Long DNA) è in grado di identificare oltre la metà dei pazienti con tumore o con

lesioni precancerose, quali gli adenomi (22).

La limitazione di questa analisi, così come finora è stata condotta, è il tipo di valutazione solo semiquantitativa. Infatti, l'approccio metodologico utilizzato è basato sulla valutazione soggettiva dei livelli di amplificazione di alcuni frammenti di DNA, definita come bassa, media ed alta. Utilizzando questo approccio, vengono considerati positivi i campioni di DNA fecale che presentano livelli di amplificazione superiori ad un valore cut-off, definito in uno studio pilota retrospettivo condotto su volontari sani e su pazienti con carcinoma coloretale.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato un metodo per la determinazione quantitativa del DNA presente nelle feci che consente la diagnosi precoce di tumore o di lesioni precancerose al colon-retto.

Il metodo dell'invenzione comprende essenzialmente i seguenti passaggi:

- 1) estrazione del DNA presente nelle feci;
- 2) amplificazioni separate, mediante PCR, di almeno tre, preferibilmente otto diversi frammenti o gruppi di frammenti genomici di lunghezza superiore alle 100 paia di basi, utilizzando primers o deossinucleotidi trifosfati marcati con molecole rivelabili;
- 3) quantificazione di ciascun amplicone;
- 4) somma delle quantità dei diversi ampliconi calcolate in (3);
- 5) confronto dei valori ottenuti in (5) con un valore di riferimento (cut-off).

L'estrazione del DNA può essere condotta con tecniche convenzionali utilizzando appositi kit disponibili in commercio. I frammenti di DNA amplificati nel passaggio (2) possono estendersi su una o più regioni genomiche, purché abbiano una lunghezza superiore alle 100 bp (paia di basi), preferibilmente tra 100



e 1000 bp, ancora più preferibilmente tra 100 e 500 bp. Più precisamente, un "frammento" secondo l'invenzione è costituito da una regione, all'interno di un determinato DNA bersaglio (p. es. un gene o una sequenza non codificante), amplificata da una coppia di primers, a condizione che detta regione amplificata, oltre ad avere una lunghezza maggiore di 100bp, sia diversa per ciascun frammento. Più frammenti, per esempio diversi esoni all'interno del medesimo gene, possono essere amplificati simultaneamente ("gruppi di frammenti").

Gli oligonucleotidi innesco (primers) o i deossinucleotidi trifosfati utilizzati nella reazione di amplificazione devono essere marcati in modo da permettere la quantificazione dei prodotti di amplificazione. Per la marcatura possono essere utilizzate molecole fluorescenti (fluorocromi), preferibilmente HEX (Applied Biosystems), 6-FAM (Applied Biosystems) e TAMRA (Applied Biosystems), o altre molecole quali biotina, digoxigenina, fluoresceina, rodamina, Cy3, Cy5, 5-FAM Ned, Vic, Pet. I marcatori sono legati chimicamente a uno o più nucleotidi all'interno o alle estremità delle sequenze primers, preferibilmente sul primo residuo nucleotidico, oppure ai deossinucleotidi trifosfati presenti nella miscela di reazione PCR.

Secondo una realizzazione preferita, i seguenti frammenti o gruppi di frammenti vengono amplificati in tre reazioni di amplificazione:

Amplificazione 1: esoni da 5 a 8 di p53 (Gene Bank n. X54156, nt. 13042-13253, 13308-13489, 13986-14124, 14404-14603);

Amplificazione 2: regioni corrispondenti agli aminoacidi 862-954 e 1035-1130 dell'esone 15 di APC (Gene Bank AF127506, M74088);

Amplificazione 3: regioni corrispondenti agli aminoacidi 1288-1402 e 1421-1515 dell'esone 15 di APC.

Nel passaggio (3), i prodotti di amplificazione corrispondenti ai diversi frammenti possono essere quantificati tramite sistemi automatici di sequenziamento ed analisi di frammenti di DNA (p. es. 3100 Avant dell'Applied Biosystem), con tecniche immunoenzimatiche, di chemiluminescenza etc.. Per determinare la quantità di ciascun amplicone è necessario preparare una curva di calibrazione mediante amplificazione di diluizioni note di DNA genomico, o plasmidi contenenti le sequenze nucleotidiche dei frammenti di DNA in esame, utilizzando gli stessi primers e le stesse condizioni dei campioni in esame. Per esempio, nella quantificazione tramite sequenziatore/analizzatore automatico di frammenti, la curva può essere costruita con i valori dell'area sottesa da ogni amplificato ottenuto da una quantità nota di DNA; sulla stessa curva viene quindi interpolato il valore risultante dal calcolo dell'area sottesa dagli amplificati dei vari campioni in esame.

Le quantità degli ampliconi corrispondenti ai diversi frammenti, espresse in unità di peso (es. nanogrammi), sono quindi sommate e il valore così ottenuto può essere confrontato con un valore di riferimento o "cut-off" precedentemente determinato da una casistica comprendente soggetti sani e soggetti nei quali è stata accertata la presenza di tumore o di lesioni del colon-retto. Tale casistica deve comprendere un numero di pazienti e di controlli sufficiente a dare un buon intervallo di confidenza (CI 95%), preferibilmente almeno 50 pazienti e altrettanti individui sani.

L'accuratezza, sensibilità e specificità del metodo lo rendono particolarmente utile nella diagnosi precoce del tumore del colon retto e nella valutazione del rischio o probabilità di sviluppo dello stesso tumore in individui con lesioni pre-cancerose al colon-retto. Rappresentano ulteriori

vantaggi del metodo la semplicità e velocità d'esecuzione e il costo ridotto.

Un altro aspetto dell'invenzione riguarda un kit idoneo all'attuazione del metodo sopra descritto. Tale kit potrà contenere gli oligonucleotidi marcati, la DNA polimerasi termostabile, soluzioni e reagenti per l'effettuazione di una reazione PCR e per l'esecuzione di un saggio (ad esempio: immunoenzimatico o fluorimetrico) che permetta la quantificazione degli amplificati. Il kit potrà inoltre contenere le istruzioni necessarie ad una corretta esecuzione del metodo dell'invenzione.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figure 1-3: Esempi di analisi per FL-DNA.

Figure 1a, 2a e 3a: elettroferogrammi dei risultati di amplificazioni di quantità note di DNA e relativo grafico ottenuto calcolando l'area sottesa dai prodotti di amplificazione, normalizzata per 100 e per il valore di ng utilizzati (valore area/100*ng utilizzati), e rapportata alla quantità di DNA della curva (1, 2, 5, 10 e 20 ng).

Figure 1b, 2b e 3b: esempi di analisi di DNA estratto dalle feci. Dai valori di area ottenuti e dalle rispettive curve standard (Fig. 1a-3a) si ricava un valore, espresso come nanogrammi (ng), espressione dei livelli di amplificazione per ogni campione.

L'FL-DNA per ogni campione è dato dalla somma dei valori in ng ottenuta dai tre gruppi di amplificazioni: p53 esoni 5-8, APC frammenti 1-2 e APC frammenti 3-4.

ESEMPIO 1

1.1 Estrazione di DNA

Tale estrazione (da circa 4 gr di feci) avviene tramite procedure

standardizzate e con l'utilizzo di un kit commerciale della ditta QIAgen. È comunque possibile utilizzare anche altri sistemi.

Il materiale fecale prima di entrare nel kit viene omogenato per 15 minuti in 16 mL di TE-9 buffer (0.5 mol/L Tris-HCl pH 9, 20 mmol/L EDTA and 10 mmol/L NaCl).

Dopo centrifugazione a 5,000 g per 15 min il supernatante viene trasferito in provette contenenti 5 mL di Ammonio Acetato 7.5 mol/L and 30 mL di Etanolo 100% per la precipitazione. Il DNA viene recuperato per centrifugazione a 5,000 g per 15 min a temperatura ambiente. Tale DNA viene quindi purificato con il kit commerciale.

1.2 Amplificazione

2 µl del DNA così estratto viene amplificato in tre reazioni di amplificazione differenti così composte:

Amplificazione 1: Amplificazione simultanea degli esoni 5, 6, 7 ed 8 del gene p53 con le seguenti coppie di primers:

Esone 5: 5-F 6-FAM-ctcttcctgcagtactcccctgc

5-R gccccagctgctcaccatcgcta

Esone 6: 6-F gattgctcttaggtctggcccctc

6-R HEX-ggccactgacaaccacccttaacc

Esone 7: 7-F 6-FAM-gtgtgtctcctaggttggtctg

7-R caagtggctcctgacctggagtc

Esone 8: 8-F acctgatttccttactgcctctggc

8-R HEX-gtctgcttgcttacctcgcttagt

Tale DNA viene quindi amplificato in 25 µl contenente 0.4 µM di ciascun primers sopra descritto, 200 µM di deossinucleotidi trifostati, Buffer



di reazione con 3.5nmol/L $MgCl_2$ e 1 unità of Taq polimerasi (QIAGEN, Hilden, Germany). Vengono effettuati 32 cicli così composti: 60s a 94°C, 60 s a 60°C e 60s a 72°C.

Amplificazione 2: Amplificazione simultanea di due regioni del gene APC utilizzando le seguenti coppie di primers:

- 1: APC-1F aactaccatccagcaacaga
APC-1R HEX-taatttggcataaggcatag
- 2: APC-2F 6-FAM-cagttgaactctggaaggca
APC-2R tgacacaaagactggcttac

Tale DNA viene amplificato in 25 µl contenente 0.4 µM di ciascun primers sopra descritto, 200 µM di deossinucleotidi trifostati, Buffer di reazione con 3.5nmol/L $MgCl_2$ e 1 unità of Taq polimerasi (QIAGEN, Hilden, Germany). Vengono effettuati 32 cicli così composti: 60s a 94°C, 60 s a 58°C e 60s a 72°C.

Amplificazione 3: Amplificazione simultanea di due regioni del gene APC utilizzando le seguenti coppie di primers:

- 3: APC-3F gatgtaatcagacgacacag
APC-3R HEX-ggcaatcgaacgactctcaa
- 4: APC 4F 6-FAM-cagtgatcttcagatagcc
APC-4R aaatggctcatcgaggctca

Le condizioni di reazioni sono le stesse utilizzate per l'amplificazione (2).

1-3 Valutazione FL-DNA

Il DNA così amplificato viene quantificato tramite sequenziatore/analizzatore di frammenti automatico dell'Applied Biosystems secondo le procedure standard dello strumento. La quantificazione avviene

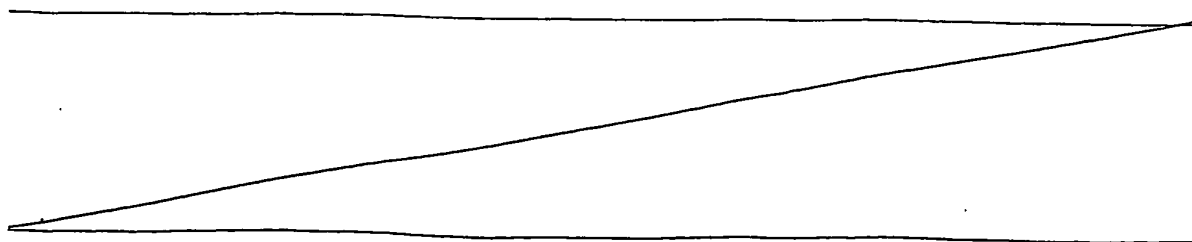
poiché in ogni reazione viene preparata una curva in cui diluizioni note di DNA genomico (1 ng, 2 ng, 5 ng, 10 ng e 20 ng) vengono amplificate con gli stessi primers e nelle stesse condizioni dei campioni. Viene costruita una curva in base al calcolo dell'area sottesa ad ogni amplificato (area amplificato/100*ng di DNA amplificato) ed ad essa viene poi riferito il risultato del calcolo dell'area sottesa agli amplificati dei vari campioni. Il valore ottenuto è espresso in ng.

ESEMPIO 2

Una serie completa di 109 campioni di feci, 53 da individui sani e 56 da pazienti con tumore coloretale, sono stati analizzati con la tecnica descritta nell'esempio 1. I livelli di L-DNA variavano da 0 a 87 ng (valore mediano 3) nei controlli e da 0 a 283 (valore mediano 53) nei pazienti.

È stato possibile determinare più dell'80% dei tumori, con una specificità superiore al 90%. I risultati dimostrano il maggiore potenziale diagnostico del metodo dell'invenzione rispetto alle tecniche basate sulla rilevazione delle alterazioni molecolari impiegate finora.

Inoltre è possibile individuare tumori del colon indipendentemente dallo stadio del tumore, dalla localizzazione nell'intestino e dalle dimensioni. Ciò permette di identificare anche lesioni di piccole dimensioni, generalmente più difficili da diagnosticare, e in regioni dell'intestino (soprattutto colon ascendente) per le quali altre tecniche di indagine molecolare sembrano fallire.



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per determinare la presenza di tumore o di lesioni precancerose nel colon-retto di un soggetto umano che comprende:

- 1) estrazione del DNA presente nelle feci;
- 2) amplificazioni separate, mediante PCR, di almeno tre diversi frammenti o gruppi di frammenti genomici di lunghezza superiore alle 100 paia di basi, utilizzando primers o deossinucleotidi trifosfati marcati con molecole rivelabili;
- 3) quantificazione di ciascun amplicone ottenuto al passaggio (2);
- 4) somma delle quantità dei diversi ampliconi;
- 5) confronto dei valori ottenuti nel passaggio (4) con un valore di riferimento.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detti primer sono marcati con molecole fluorescenti.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui dette molecole fluorescenti sono HEX, 6-FAM e TAMRA.

4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui vengono amplificati separatamente otto frammenti genomici.

5. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detti frammenti genomici hanno una lunghezza compresa tra 100 e 500 bp.

6. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui ciascuno di detti frammenti genomici si estende in regioni diverse del gene p53 o del gene APC.

7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui quattro frammenti di p53, corrispondente agli esoni 5-8, sono amplificati con le seguenti coppie di primers (F= forward, R= reverse):

- F 6-FAM-ctcttctgcagtactccctgc, R gcccagctgctcaccatcgcta
- F gattgctcttaggtctggccctc, R HEX-ggcoactgacaaccacccttaacc
- F FAM-gtgttgctcctaggttgctctg, R caagtggctcctgacctggagtc
- F acctgatttccttactgcctctggc, R HEX-gtctgcttgcttacctcgcttagt

8. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui due frammenti di APC sono amplificati con le seguenti coppie di primers:

- aactaccatccagcaacaga; HEX-taatttgccataaggcatag
- 6-FAM-cagttgaactctggaaggca, tgacacaaagactggcttac

9. Metodo secondo le rivendicazioni 6, in cui due frammenti di APC sono amplificati con le seguenti coppie di primers:

- gatgtaatcagacgacacag, HEX-ggcaatcgaacgactctcaa
- 6-FAM-cagtgatcttcagatagcc; aaatggctcatcgaggctca

10. Metodo secondo le rivendicazioni 1-9, in cui la quantificazione di ciascun amplicone è effettuata mediante interpolazione di una curva di calibrazione ottenuta con quantità note di DNA genomico.

11. Metodo secondo la rivendicazione 10, in cui la quantificazione è condotta tramite sistemi automatici di sequenziamento/analisi di frammenti o sistemi di rilevazione fluorimetrici, colorimetrici, radioattivi o spettrofotometrici.

12. Metodo secondo le rivendicazioni precedenti, in cui il valore di riferimento è determinato da una casistica comprendente soggetti sani e soggetti nei quali è stata accertata la presenza di tumore o di lesioni del colon-retto.

13. Kit contenente gli oligonucleotidi, un sistema di marcatura, la DNA polimerasi termostabile e le istruzioni necessarie all'esecuzione del metodo



delle rivendicazioni 1-12.

Milano, 7 marzo 2003

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

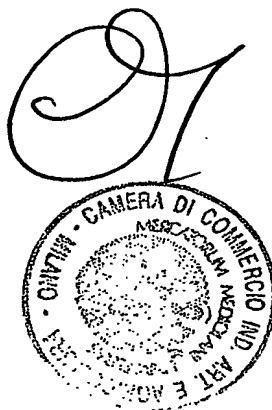
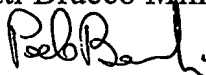
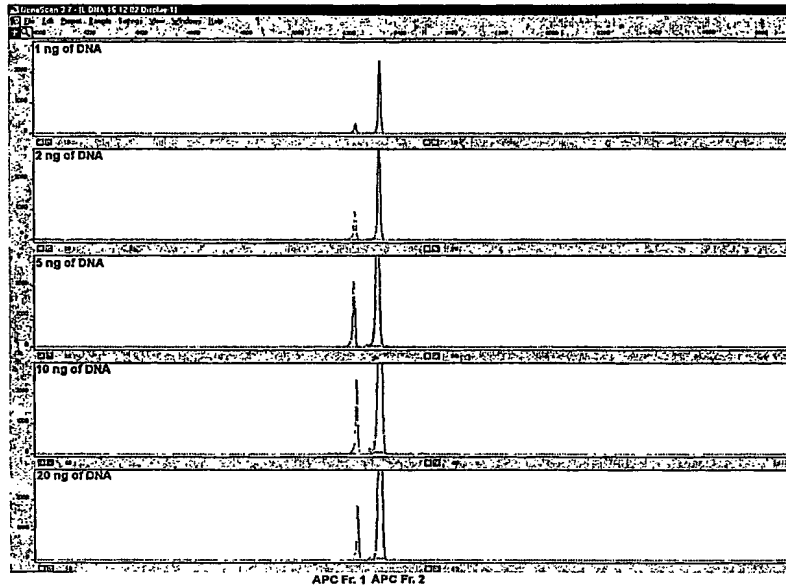
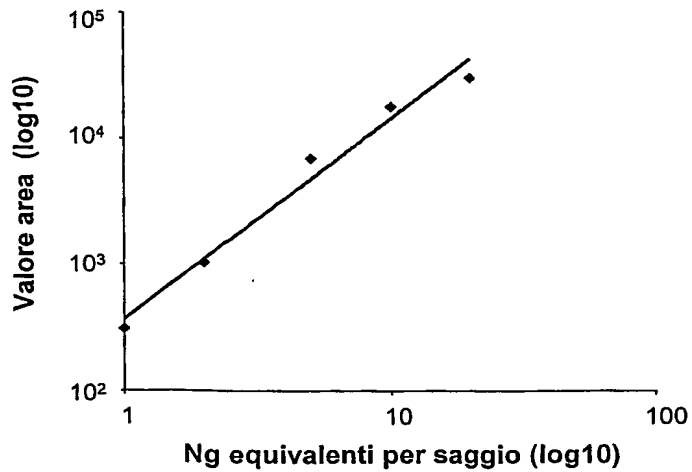


Figura 1a

APC fr. 1-2



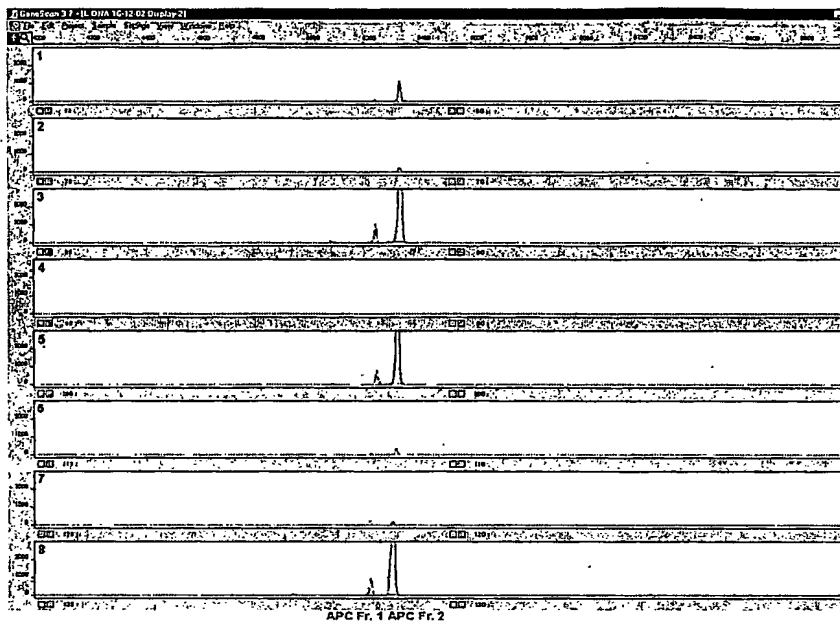
Curva standard



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Figura 1b

Risultati

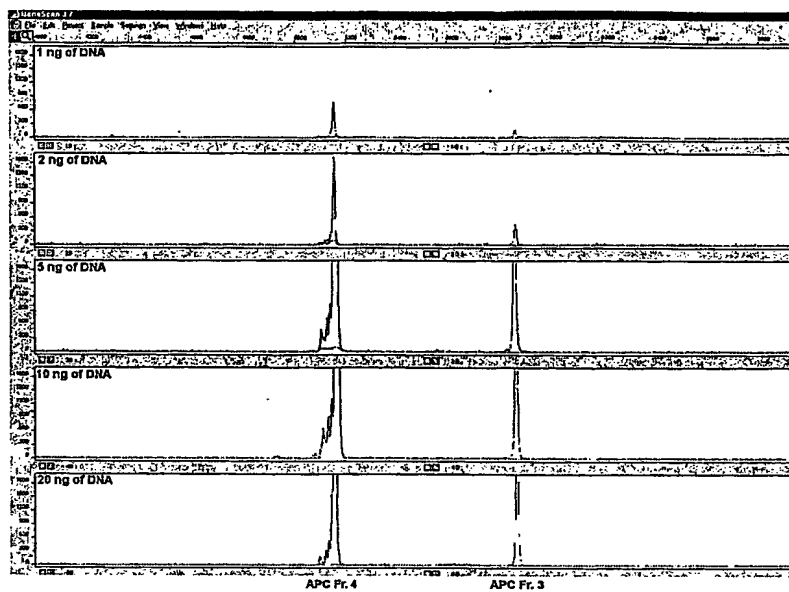


Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

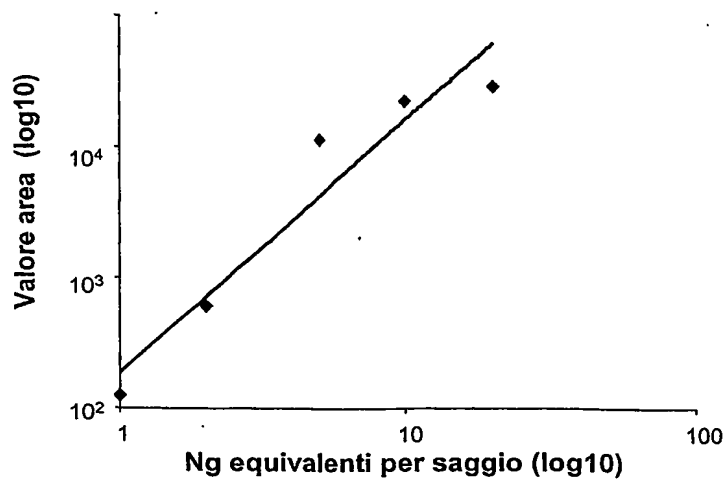
Handwritten signature of Paolo Banfi

Figura 2a

APC fr. 3-4



Curva standard



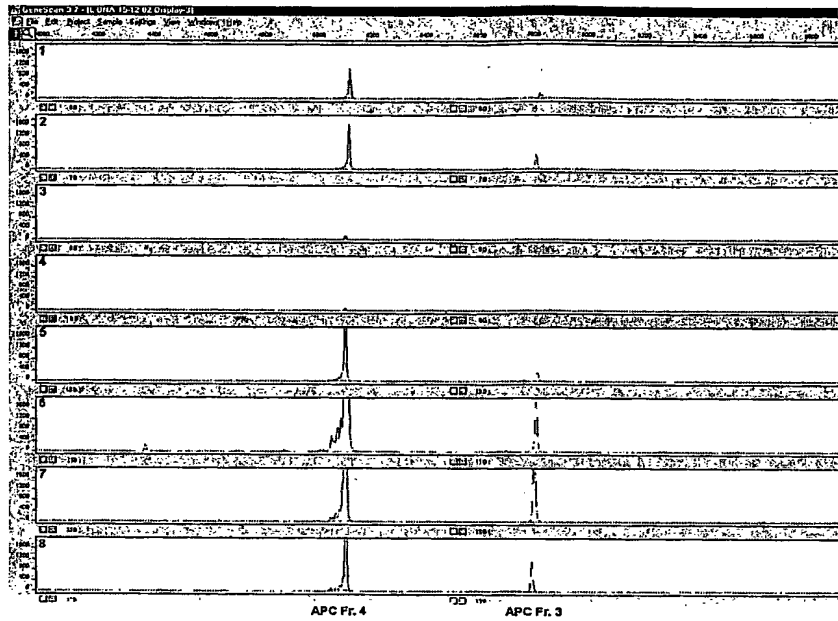
Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature of Banfi Paolo



Figura 2b

Risultati

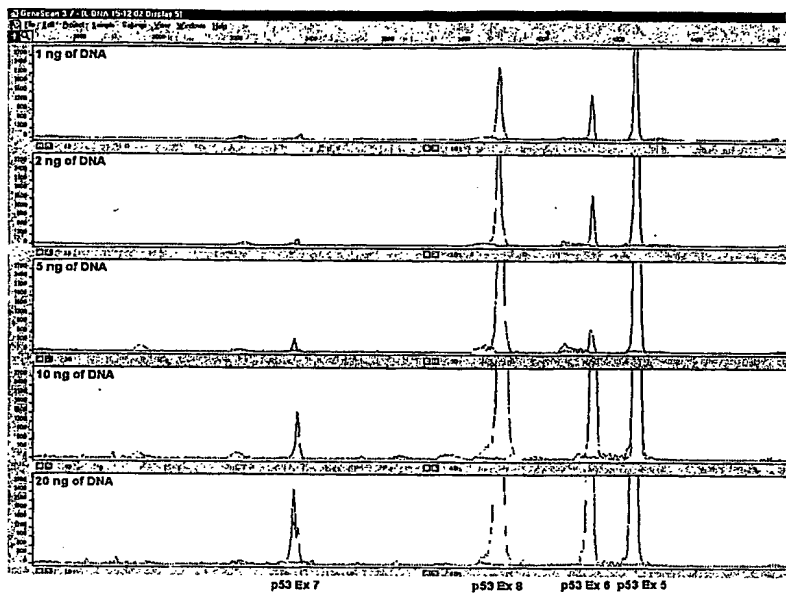


Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

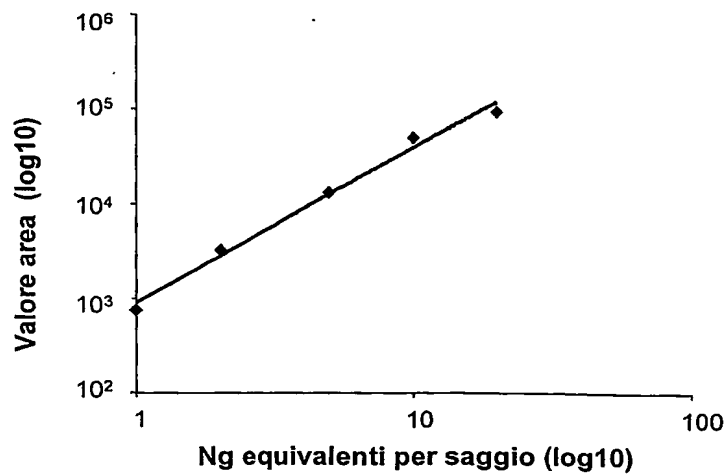
Banfi Paolo

Figura 3a

p53 ex. 5-8



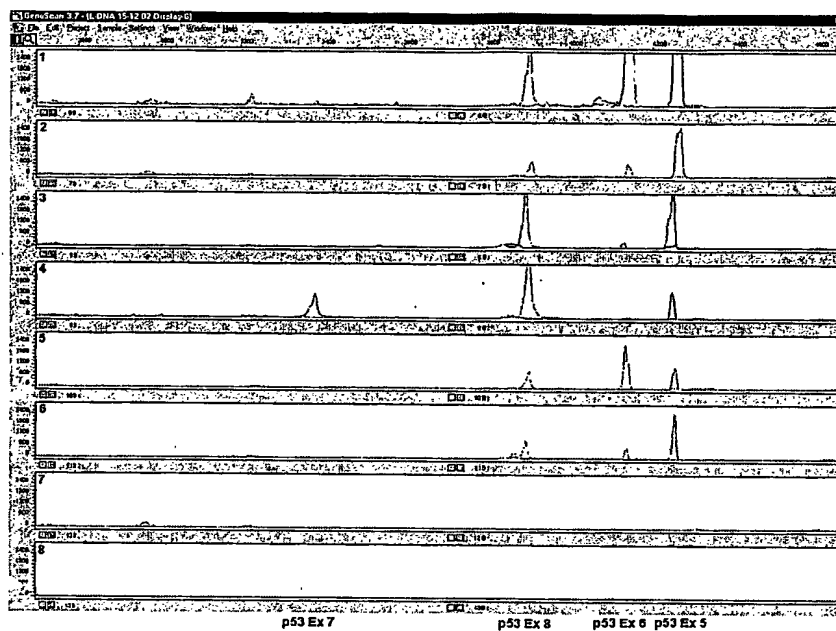
Curva standard



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Figura 3b

Risultati



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**